

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/087767 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C07K 19/00, 5/068, 5/11, 7/06, 7/08, 14/315, A61K 39/09, A61P 31/12
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004460
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 29 日 (29.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-93243 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 Okayama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西澤 俊樹 (NISHIZAWA, Toshiki) [JP/JP]; 〒176-0022 東京都練馬区向山3丁目1472番地5 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: POLYPEPTIDE

(54) 発明の名称: ポリペプチド

(57) Abstract: It is intended to provide polypeptide capable of inducing the potentiation of antibody production when transmucosally administered without resort to any immune adjuvants, a composition containing the polypeptide and use thereof. These objects can be achieved by establishing a polypeptide which is obtained by bonding the amino acid sequence of the adhesion motif of a cell adhesion molecule to a polypeptide comprising a peptide consisting of the amino acid sequence of a multi-agreotype type T cell epitope in its amino-terminal side and the amino acid sequence of a B cell epitope in its carboxyl-terminal side while having a linker peptide between these amino acid sequences, and providing a composition containing the polypeptide and use thereof.

(57) 要約: 免疫アジュバントを使用することなく、経粘膜投与で、抗体産生の増強を誘導することのできるポリペプチド、及び、そのポリペプチドを含有する組成物並びにその用途を提供し、ポリペプチドのアミノ末端側に、マルチアグレート型T細胞エпитープのアミノ酸配列からなるペプチドを有し、リンカーペプチドをはさんで、カルボキシル末端側にB細胞エпитープのアミノ酸配列を有し、さらに、このポリペプチドに細胞接着分子の接着モチーフのアミノ酸配列を結合させたポリペプチドを確立し、それを含有した組成物とその用途を提供することにより解決する。

WO 2004/087767 A1

明 細 書

ポリペプチド

5 技術分野

本発明は特定の抗原エピトープを含み、免疫アジュバント非存在下においても、経粘膜投与により、この抗原エピトープに対する特異抗体の産生を効率よく誘導するポリペプチド、このポリペプチドを含有する組成物、およびその用途に関し、より詳細には、抗体産生の対象となる抗原のB細胞エピトープを含むポリペプチドとT細胞エピトープを、プロテアーゼの認識配列のアミノ酸からなるリンカーペプチドで連結し、このポリペプチドに、さらに、細胞結合モチーフのアミノ酸配列からなるペプチドを連結した、目的抗体の産生を効率よく誘導するポリペプチド、このポリペプチドを含有する組成物及びその用途に関する。

背景技術

生体に、特定の抗原に対して特異的な抗体産生のみを誘導する場合には、精製した抗原を単独で、或いは、抗体産生を増強する活性を有する免疫アジュバント（免疫機構を非特異的に刺激することによって、抗原に対する特異的免疫反応を強める物質）と共に生体に投与する方法が一般的に用いられてきた。この方法は、種々の感染症に対する最も有効な予防手段としても汎用されており、特に抗生物質が無効であるウイルスや、微生物が産生する毒素などのように、他に有効な予防或いは治療方法がない場合には、生体に、これらのウイルスや毒素に対する抗体産生を誘導し、防御することが唯一の

対策である場合も多い。現在この方法が実用化されているものとしては、病原微生物を有機溶媒や紫外線照射等で不活化して感染性を無くした不活化ワクチン及び病原体を弱毒化して生体への病原性を弱めた弱毒化ワクチンであり、ポリオウイルスワクチンを除き、
5 全て注射により非経口的に投与されている。しかしながら、不活化ワクチンの場合、防御に必要な抗体価を得るためには数回の注射を繰り返す必要があり、生体への負担が大きく利便性にも劣っているとの問題を抱えている。

また、生ワクチンの場合、保存安定性に欠けるだけでなく、ワクチン投与後に突然変異を起こし強毒化株となり生体に害を引き起こす可能性がある。さらには、不活化ワクチン、生ワクチンとも生体に対してアナフィラキシーショックを与えることもあり、安全性に欠ける面があった。さらにウイルス粒子そのもの、或いは、蛋白巨大分子を免疫原として用いるため、ワクチン製剤とした際の安定性
15 性に欠け、安定性を保持するためヒト血清アルブミンやゼラチン等を製剤の安定剤として用いる場合もあった。このためこれら安定剤に用いた物質に未知の感染性微生物の混入が否定できないこと、或いは、安定剤に対する生体のアナフィラキシーショックが生じることもあり、安全性、安定性に欠けるものであった。また大部分のワクチンは注射剤として製剤化されているものの、感染症の発生により多くの人命が奪われている地域の多くは発展途上国であり、ワクチンの普及を図るには安定性に優れた製剤で、かつ、注射剤以外のより簡便な投与が可能なワクチン製剤が求められている。
20

これらの課題を解決するために、不活化ワクチンや生ワクチンよりも高い安全性と有効性をもつ、不活化ワクチンや生ワクチンの部分アミノ酸配列からなるポリペプチドを利用した新型ワクチンの
25

開発研究が世界中で鋭意進められており、B型肝炎ウイルスワクチンに代表される組換え型ワクチンやコンポーネントワクチンは、その新型ワクチンの代表例である。しかしながら、ワクチンとして利用するポリペプチドの鎖長は短いものほど望ましいものの、短くすればするほど、生体が個別にもつ主要組織適合性抗原（以下、「MHC」と略記する。）のクラスIIハプロタイプの拘束性を幅広くカバーし、十分な免疫原性を有するようにデザインすることが難しくなる。また、経粘膜投与時の抗原の免疫原性を高める方法としては、対象とする抗原とともに、コレラ毒素（以下、「CT」と略記する。）や大腸菌由来の熱不安定型のエンテロトキシンや、これらのアミノ酸配列の一部を置換して弱毒化したものを免疫アジュバントとして投与する方法が知られてはいるものの（イー・シー・ラベル（Lavellie, E. C.）著、イムノロジー（Immunology）、第99巻、30乃至37頁、（2000年））、目的とする抗原以外に、免疫アジュバントとして使用したコレラ毒素や大腸菌由来の熱不安定型のエンテロトキシンに対する抗体が産生されるなどの問題があり、実用に供されていない。

一方、歯科における微生物が原因とされる二大疾患には、う蝕症と歯周病があり、これらは、一般的な疾患で、且つ、致命的でないために、その予防や治療にはより高度な安全性が求められている。このう蝕症予防の手段として、例えば特開平6-122633号公報には、ストレプトコッカス・ミュータンス菌由来の歯面への付着性を有する蛋白質の断片ペプチドで免疫した動物の抗体を利用する（受動免疫）方法が開示されており、特表2002-511422号公報においては、ストレプトコッカス・ミュータンス由来のT細胞エピトープに、同じストレプトコッカス・ミュータンス由来の

B細胞エピトープ（グルカンバインディング蛋白質）からなるう蝕予防用のワクチンが記載されている。

また、これとは別に、本発明者は、う蝕予防効果があることが知られているストレプトコッカス・ミュータンス セロタイプC (*S*
5 *t r e p t o c c o c u m u t a n s s e r o t y p e C*)
の歯面への初期付着に關与する表層蛋白質抗原（以下、「P A c」と略記する。）に対する抗体の産生を誘導する系を実験モデルとして使用し、経粘膜投与により、免疫アジュバント非存在下でも、複数のM H CクラスI Iのハプロタイプ（遺伝子型）の個体において、
10 P A cに対する抗体産生を効率的に誘導できる短鎖ポリペプチドを開発する目的で、研究を行ってきた。すなわち、P A cのアミノ末端から365乃至377番目までのアミノ酸配列であるところの配列表における配列番号1記載のアミノ酸配列を有するペプチドをB細胞エピトープとして使用し、このペプチドのアミノ末端側
15 に、複数のM H CクラスI Iのハプロタイプの拘束を同時に受けるT細胞エピトープを結合し、その間を例えばリジンーリジン配列からなるジペプチドリンカーで、直線的に連結することにより、う蝕を抑制することのできる抗体の産生を増強する方法を提案した（西沢俊樹、今井奨、花田信弘、第4回日本ワクチン学会学術集会プログラム・抄録集、第77頁（2000年）、オオイシ、ワイ（O i
20 *s h i , Y .*）等、オーラル マイクロバイオロジー アンド イムノロジー（*O r a l M i c r o b i o l o g y a n d I m m u n o l o g y*）、第16巻、第40～44頁（2001年））。
しかしながら、これらの文献に開示されるポリペプチドも免疫アジ
25 バント非存在下で経粘膜的に投与した場合には、免疫原性が弱く、ポリペプチドを投与しても生体に対して十分な抗体を誘導しない

という欠点が解決できなかった。さらに、特表平 8-504118 号公報には、T 細胞エピトープのカルボキシル末端側に B 細胞エピトープを結合したトラコーマクラミジアの感染防止用の合成ペプチドワクチンが開示されているものの、経粘膜投与では十分な抗体産生を誘導することはできない。

斯かる状況に鑑み、本発明の課題は、経粘膜投与であっても十分な量の目的とする抗体を生体内で産生誘導可能であり、安全に投与できるペプチドワクチンを提供することにある。

10 発明の開示

本発明者は、上記課題を解決するために、う蝕の原因となる微生物のストレプトコッカス ミュータンスの PAc (菌体表層蛋白質抗原) 由来の断片ペプチドをモデルとして使用して、う蝕の原因となる微生物の感染防御に有効な抗体の産生を増強できるポリペプチドの研究を進めてきた。その結果、ポリペプチドのアミノ末端側に、複数の MHC クラス II のハプロタイプで同時に拘束される T 細胞エピトープを含むアミノ酸配列を有し、リンカーペプチドとしてプロテアーゼの認識アミノ酸配列を挟んで、カルボキシル末端側に抗体誘導用の B 細胞エピトープを含むアミノ酸配列を有し、さらに、このポリペプチドに細胞結合モチーフと相同なアミノ酸配列を有するペプチドを結合したポリペプチドが、免疫アジュバント非存在下で経鼻などの経粘膜投与した場合において、複数の MHC クラス II のハプロタイプにおいて、目的とする抗原に対する特異抗体の十分な産生を効率よく増強し、しかも、目的とする特異抗体以外の抗体の産生誘導能が低く、また、アナフラキシーなどの副作用を誘発しない、安全性の高いポリペプチドであることを見出した。ま

た、このポリペプチドが、免疫アジュバントなしに経粘膜投与した場合でも、抗体産生を誘導できること、さらには、このポリペプチドが免疫アジュバント効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

- 5 すなわち、本発明は、アミノ末端側にT細胞エпитープを含むアミノ酸配列を有し、リンカーペプチドをはさんで、そのカルボキシル末端側にB細胞エпитープを含むアミノ酸配列を有するペプチド内に、細胞接着分子の細胞結合モチーフと相同アミノ酸配列を有するポリペプチドを提供することによって前記課題を解決するものである。
- 10

発明を実施する上での最良の形態

- 本発明でいう抗体とは、主としてイムノグロブリンG (I g G)、イムノグロブリンM (I g M)、イムノグロブリンA (I g A) 抗体であり、血中や体液中に分泌されるものはもとより、鼻腔、口腔、眼、消化管などに分泌される抗体も当然これに含まれる。
- 15

- 本発明のポリペプチドにおいて、抗体産生を誘発する部位として使用するのは、B細胞エпитープ或いはそれを含むアミノ酸配列部分である。また、このペプチドのアミノ酸配列は、微生物、細胞、又は腫瘍細胞に由来する毒素、アレルゲン、酵素、細胞膜抗原、腫瘍特異性抗原などの抗原であって、その各々について文献的に既に明らかにされている既知の抗原エпитープのアミノ酸配列そのものでもよく、また実際に生体に対して免疫原性をもつ様々な抗原そのもの、或いは、常法により、抗原の部分ペプチドを免疫してエピ
- 20
- 25 トープ配列を同定し、この同定したアミノ酸配列を有するポリペプチドをB細胞エпитープとして用いてもよい。また、このB細胞エ

ピトープは、後述のT細胞エピトープと同じ抗原上にあるものでもよく、B細胞エピトープとそのアミノ酸配列の一部又は全部を共有していてもよい。従って、B細胞エピトープ部分については、感染防御、癌、腫瘍、潰瘍、肝炎など炎症性疾患、アレルギー及びアトピー性皮膚炎などの免疫性疾患などの予防や治療、酵素の中和、臨床検査などに使用される各種抗原の検出など、誘導する抗体の使用目的に応じて、好ましい抗原ポリペプチドを選択することが出来る。例えば、う蝕予防用の抗体を誘導するためには、西沢俊樹、今井奨、花田信弘、第4回日本ワクチン学会学術集会プログラム・抄録集、第77頁（2000年）に記載の前記P A cの断片ペプチドを使用することができ、具体的には、配列表における配列番号1記載のアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。これらのB細胞エピトープを含むポリペプチドはそのまま使用してもよく、タンデムに連結して、その2量体、3量体あるいは多量体として使用してもよい。また、同一抗原上に存在する2種以上のB細胞エピトープをタンデムに連結することも、抗原全体をB細胞エピトープとすることもできる。また、複数種の抗原性タンパク質が関与する疾患治療の場合、それらのB細胞エピトープをタンデムに連結することにより、1つのポリペプチドで複数種の抗原性タンパク質に対する抗体を産生できるポリペプチドを設計することも随意である。この場合には、各B細胞エピトープの間に、後述のリンカーペプチドを挿入することにより、個々のエピトープのプロセッシングをより確実に行わせることもできる。

また、本発明のポリペプチドに使用する、T細胞エピトープを含むポリペプチドのアミノ酸配列とは、投与の対象となるヒトを含む哺乳動物、鳥類、爬虫類、または、魚類のMHCクラスIIのハプ

ロタイプに拘束され、ヘルパーＴ細胞用抗原として提示を受けるアミノ酸配列或いは、それを含むアミノ酸配列のものであれば何れでもよい。このポリペプチドのアミノ酸配列は、文献的に既に明らかにされているＴ細胞エピトープのアミノ酸配列を利用してもよく、

5 また、実際に生体に対して、常法により、抗原の部分ペプチドを免疫してエピトープ配列を同定し、この同定したアミノ酸配列を有するポリペプチドをＴ細胞エピトープとして用いてもよい。このＴ細胞エピトープは、前述したＢ細胞エピトープを含む抗原上にあってもよく、Ｂ細胞エピトープとそのアミノ酸配列の一部又は全部を共有していてもよい。これらのＴ細胞エピトープペプチドはそのまま

10 使用しても、あるいは同種又は複数種のＴ細胞エピトープをタンデムに連結して使用してもよい。また、Ｔ細胞エピトープは、アグレトープ（ＭＨＣクラスⅡ抗原との結合に必要なアミノ酸残基）となるアミノ酸残基以外のアミノ酸残基は他のアミノ酸残基に置換

15 しても機能を発揮することが可能である。よって、本発明で用いるＴ細胞エピトープポリペプチドとして、アグレトープが保存されたポリペプチドであれば用いることができる。そこで、本発明のポリペプチドを感染防御や抗アレルギー等の予防又は治療を目的として用いる場合には、多くの患者に対して適用可能とならしめるため

20 に、Ｔ細胞エピトープポリペプチド部分として、複数種のＭＨＣクラスⅡハプロタイプに対するアグレトープをタンデムに又はオーバーラップして有するポリペプチド（いわゆるマルチアグレトープ型ポリペプチド）は極めて有用である。現在、ＭＨＣクラスⅡのハプロタイプによる拘束性ペプチドの基本構造およびアグレトープは、文献的に数多く開示されており、これらを参考に、使用目的

25 的に併せてＴ細胞エピトープを含むポリペプチドを設計すること

も随意である。また、異種の動物における T 細胞エピトープ又はア
グレトープをタンデムに又はオーバーラップして有するポリペプ
チドを T 細胞エピトープポリペプチドとして用いれば、複数種の動
物に対しても有効な T 細胞エピトープポリペプチドとすることが
5 できる。

また、B 細胞エピトープにおいても、複数のエピトープを重複さ
せたり、タンデムに連結させたりして、複数種の抗体を同時に誘導
させるようなポリペプチドを設計することも随意である。

T 細胞エピトープを含むポリペプチドと B 細胞エピトープを含
10 むポリペプチドを連結しないで別々に免疫しても、目的とする抗体
の効率的な産生の増強は望めない。また、B 細胞エピトープを含む
ポリペプチドと T 細胞エピトープを含むポリペプチドとを連結し
たポリペプチドを用いて免疫した場合、目的とする抗体とともに、
連結部分のアミノ酸配列部分を認識する抗体を同時に誘導するこ
15 とがある。そこで、本発明のポリペプチドにおいて、T 細胞エピ
トープ配列と B 細胞エピトープ配列の間に、プロテアーゼの認識配列
となるアミノ酸配列からなるリンカーペプチドを挿入すること
により、抗原提示におけるプロセシングのプロセスにより両ポリペ
チドを酵素的な切断を受けて分離させ、連結部分のアミノ酸配列部
20 分を認識する抗体の産生誘導が抑制されるようにデザインされて
いる。よって、免疫原性に優れ、生体に防御効果を示すために十分
な抗体の産生を増強し、免疫したペプチドに対する抗体ではなく、
組み込まれた B 細胞エピトープが由来する抗原性タンパク質に対
する抗体産生を増強することが可能となる。

25 本発明で用いられる、B 細胞エピトープを含むペプチドと T 細胞
エピトープと結合するためのリンカーペプチドは、抗原プロセッシ

ングに關与するプロテアーゼの認識配列であれば何れでもよく、具体的には、リジンーリジン（KK）、リジンーアルギニン（KR）、アルギニンーアルギニン（RR）などジペプチドを挙げる事ができ、なかでも、カテプシンBの認識配列であるリジンーリジンからなるジペプチドを使用することが望ましい。なお、T細胞エピトープとB細胞エピトープが重複して存在するポリペプチドを用いる場合には、そのポリペプチド同士をリンカーペプチドで連結することにより、それぞれを、T細胞エピトープ或いはB細胞エピトープとしての機能を發揮させることができる。

- 10 本発明で使用する細胞接着分子の細胞結合モチーフとしては、本発明のペプチドを粘膜表面に長期間保持することのできるものである限り本発明に利用することができる。例えば、インテグリンファミリーに対する結合モチーフをはじめとし、その他の細胞結合モチーフのアミノ酸配列を用いることができる。例えば、インテグリン結合モチーフに属するアミノ酸配列としては、フィブロネクチン、
- 15 コラーゲン、ビトロネクチン、フィブリノーゲン、ラミニン、ヒト免疫不全ウイルス（以下、「HIV」と略記する。）のTatタンパク質等々の細胞接着分子上に存在する結合モチーフとして知られる、アルギニンーグリシンーアスパラギン酸（RGD：配列表における配列番号2）、アルギニンーグルタミン酸ーアスパラギン酸（RED：配列表における配列番号3）、ロイシンーアスパラギン酸ーバリン（LDV：配列表における配列番号4）、プロリンーヒスチジンーセリンーアルギニンーアスパラギン（PHSRN：配列表における配列番号5）、アルギニンーリジンーリジン（RKK：配列表における配列番号6）、アスパラギン酸ーグリシンーグルタミン酸ーアラニン（DGEA：配列表における配列番号7）などのアミ
- 20
- 25

ノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。また、インテグリンのファミリー以外の結合モチーフとしては、チロシンーイソロイシンーグリシンーセリンーアルギニン（Y I G S R：配列表における配列番号 8）、イソロイシンーリジンーバリンーアラニンーバリン（I K V A V：配列表における配列番号 9）、アルギニンーフェニルアラニンーチロシンーバリンーバリンーメチオニンートリプトファンーリジン（R F Y V V M W K：配列表における配列番号 10）、イソロイシンーアルギニンーバリンーバリンーメチオニン（I R V V M：配列表における配列番号 11）などのアミノ酸配列からなるペプチドを挙げることができる。なかでも、R G D、R E D、Y I G S R のアミノ酸配列からなるペプチドが、特異的な抗体産生の誘導能が強いことから望ましい。また、これら細胞結合モチーフのアミノ酸配列を有するペプチドの連結部位は、T 細胞エピトープポリペプチドのアミノ末端側又はカルボキシル末端側、又は、B 細胞エピトープポリペプチドのアミノ末端側又はカルボキシル末端側の合計 4 箇所から選択でき、そのうちすくなくとも 1 箇所に連結すればよい。とりわけ、T 細胞エピトープポリペプチドのアミノ末端側又はカルボキシル末端側の片側又は両側に連結した本発明のポリペプチドは、B 細胞エピトープポリペプチドに特異的な抗体産生が特に増強されるので望ましい。

本発明のポリペプチドを製造するための方法に限定はなく、慣用のペプチド合成法によるか、或いは、慣用のペプチド合成法によりあらかじめ、部分的に合成したペプチド同士を結合して、調製することができる（例えば、社団法人日本生化学会編「新生化学実験講座」、第 1 巻、「タンパク質 V I」、第 3～44 頁、1992 年、東京化学同人発行参照。）。また当該ペプチドは、各メーカーから市販

されているペプチドシンセサイザーを用いて装置のプロトコールに従って合成することができる。また、本発明のポリペプチドは、組換えDNA技術により調製することができる。例えば、設計したポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、これを
5 自立増殖可能なベクターに挿入し、それを大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母などの微生物、動植物やそれらの細胞又は組織等の宿主に導入して形質転換体としたり、トランスジェニック動植物を作製して、それらを培養、育成した後、本発明のポリペプチドを適宜の方法により、採取・精製することができる。また、本発明のポリペプチドを、
10 T細胞エピトープとB細胞エピトープを連結するのに用いたプロセシング関連酵素切断部位となるアミノ酸配列以外から選ばれた適宜のタンパク質分解酵素の切断部位となるアミノ酸配列で連結して発現させた後、当該酵素で分解したものを使用することも自由である。さらには、本発明のポリペプチドを発現させた菌体、動物体
15 或いは植物体をそのまま加工して、本発明のポリペプチドを含有する経口摂取用の組成物として使用することも随意である。また、本発明のポリペプチドは、前記の何れかの方法により、その全アミノ酸配列を有するポリペプチドを直接調製してもよく、或いは、予め、その一部アミノ酸配列を有するポリペプチドを合成したものの同
20 士を、化学的に結合して調製することも随意である。

本発明のポリペプチドは、特異的な抗体産生の誘導のために、このまま単独で、或いは、同一のB細胞エピトープを有するポリペプチドを複数組み合わせで使用することができる。さらに、複数種の抗原に対する抗体を同時に産生させる場合には、個々の抗原に対応
25 するB細胞エピトープを有するポリペプチドの2種以上を組み合わせ使用することも随意である。また、本発明の効果を妨げない

限り、本発明のポリペプチドに、製剤学的に許容できる１種又は２種以上の製剤用添加剤を組み合わせた組成物を調製することも有利に実施できる。製剤用の添加剤としては、グルコース、マルトース、トレハロース、ショ糖などの還元性或いは非還元性の糖質、ソルビトール、マンニトール、マルチトールなどの糖アルコール、寒天、プルラン、グアガム、アラビアガムなどの水溶性高分子、ゼラチン、シルクなどのタンパク質やそれらの加水分解物、脂質、アミノ酸、緩衝剤、安定化剤、抗菌剤、香料、栄養機能食品、医薬部外品或いは医薬品の有効成分、ミョウバン、水酸化アルミニウムなどの免疫アジュバントなどが挙げられ、１種又は２種以上を適宜組み合わせ使用できる。また、本発明のポリペプチドを含有する製剤の形態としては、その製剤中のポリペプチドが長期間安定に保持されるものであれば特に制限はなく、溶液、凍結乾燥品、錠剤、舌下錠、トローチ、粉末、顆粒、クリーム、軟膏、シラップなどの剤形から、投与対象、投与方法、製剤の保存方法や輸送方法を考慮して適宜選択すればよい。また、本発明のポリペプチド又はそれを含有する組成物は、必要に応じて、リポソームに封入したり、皮膚、組織への浸透促進剤やイオン導入法などを併用することにより、抗原提示細胞の存在部位への浸透を促進させることも有利に実施できる。また、本発明のポリペプチドは、錠菓、飴、清涼飲料などの各種飲食品に含有せしめ、これを経口的に摂取することにより、ポリペプチドを経粘膜的に摂取させることも随意である。また、本発明のポリペプチドをコードするRNAを直接生体に投与したり、細胞にDNAを導入するいわゆる遺伝子治療などにより、生体内において本発明のポリペプチドを発現させることもできる。

本発明のポリペプチドは、ヒト、イヌ、ネコ、マウスをはじめと

する哺乳類、ニワトリ、アヒルをはじめとする鳥類、爬虫類、魚類
とりわけ養殖魚類などの抗体産生を行う動物に対して、病原性のウ
イルス、微生物、細菌などの構成蛋白質やそれらが分泌する毒素に
対する抗体を産生させることができる。したがって、ポツリヌス、
5 大腸菌 O H - 1 5 7 などの細菌に起因する食中毒、破傷風、ジフテ
リア、インフルエンザなどの感染性疾患の予防又は治療に有効であ
る。また、アミロイド β ペプチドに対する抗体を産生させることによ
るアルツハイマーの治療、ダニ、ハウスダスト、花粉、食物など
に由来のするアレルゲンに対する特異的な I g G 抗体を優位に産
10 生させることによる各種アレルギー症やアトピー性皮膚炎などの
経口減感作療法に有利に利用できる。また、本発明のポリペプチド
は、口腔内、鼻腔、眼、咽喉、膣内、気管内、腹腔、胸腔、肺胞内、
食道内、及び、胃や腸などの消化管内などへの経粘膜的な投与で粘
膜における I g A 抗体産生の誘導及び体液中への I g G 抗体産生
15 の誘導が可能であり、皮下、皮内、筋肉内などの通常のワクチンの
投与経路での投与、さらに、場合によっては、血管内投与も可能で
ある。また、本発明のポリペプチドは、任意の蛋白質やポリペプチ
ドに対する特異的な抗体の生産に利用できるだけでなく、単独では
抗原性の低いオリゴペプチドやポリペプチドに対する抗体の生産
20 に有利に用いることができる。したがって、合成オリゴペプチドを
動物に免疫することによる抗血清やモノクローナル抗体産生を目
的として、前記投与経路による動物での使用に加えて、試験管内で
の免疫担当細胞の感作に有利に使用することができる。

また、本発明のポリペプチドは、他の抗原あるいはそのポリペプ
25 チドにおける B 細胞エпитープが由来する抗原性タンパク質と同
時に生体に投与することにより、同時に投与された抗原に対する抗

体産生を誘導する免疫アジュバントとして使用することができる。
その際の使用量は、同時に投与する他の抗原あるいはそのポリペプ
チドにおけるB細胞エпитープが由来する抗原に対する抗体産生
を誘導できる量であれば特に制限はない。ただし、本発明のポリペ
5 プチドに対する抗体産生が誘導されることを望まない場合は、本発
明のポリペプチドの投与量は、他の抗原の投与量の10質量%以下、
好ましくは1質量%以下、さらに好ましくは、0.1質量%以下の
とすればよい。

本発明のポリペプチドのヒトを含む動物への投与方法には、特に
10 制限はなく、このポリペプチドが、投与部位へ確実に到達できる方
法であれば何れでよい。例えば、スポイトや注射器を使用して適量
を粘膜上に滴下してもよく、経口摂取や、クリーム或いはジェル状
にして粘膜に塗布したり、カテーテル等で投与部位に誘導してもよ
く、さらには、スプレーやネブライザーなどにより霧状にして吹き
15 付けたり、鼻、気管或いは肺へ吸引させてもよい。皮下、皮内、筋
肉内、血管内、腹腔内や胸腔内などの体腔内への投与には、注射器、
カテーテル、点滴などの投与方法を使用することができる。本発明
のポリペプチドの投与量は、抗体誘導能、疾患の種類、投与経路、
投与方法、投与対象動物などを考慮して適宜決定すればよく、通常、
20 0.00001乃至100mg/kg体重、好ましくは0.0001
乃至25mg/kg体重、さらに好ましくは0.001乃至10
mg体重である。

以下、実験例に基づいて本発明のポリペプチドについてより詳細
に説明する。

生体の感染防御用のワクチンとして利用できるポリペプチドの開発を考慮して、う蝕症の病原体であるストレプトコッカス ミュータンス (*Streptococcus mutans* serotype C) の菌面付着因子の一つである P A c (菌体表層タンパク質抗原) に対する抗体産生系をモデルに使用して、経粘膜的に投与して、効率的に誘導することのできる、ワクチンとしての機能を有するポリペプチドを調製するための実験を以下のようにして行った。また、実験には、P A c 中のアミノ酸配列であって、すでに、遺伝子クローニング、塩基配列、アミノ酸配列、生物活性部位、B細胞エピトープ、T細胞エピトープの解析から、P A c 分子に交叉反応性を持ち、そのう蝕を阻害する活性を有する抗体のみを誘導できる最小単位のペプチド抗原であることが公知の配列表における配列番号 1 記載のアミノ酸アミノ酸配列のペプチド (以下、「ユニットペプチド」という。) を使用した (H. SENPUKUら、*Infection and Immunity*, 63:4695-4703 (1995) 参照)。なお、以下の実験で使用したポリペプチドは、全てペプチドシンセサイザー (アドバンスド・ケムテック (Advanced Chemtech) 社製造、Model 350 Multiple Peptide Synthesizer) を用いて Fmoc 法にて合成し、TSK-GEL カラム (カラムサイズ: 直径 1 cm、長さ 30 cm、東ソー株式会社製造) を使用した逆相 HPLC で精製した純度 95% 以上の標品である。

実験例 1 : ユニットペプチドに対するマウスの MHC クラス II のハプロタイプの拘束性の解析

MHC クラス II のハプロタイプのみが異なる 8 種類の B10

コンジェニックマウス（日本 S L C 株式会社販売、雌；5 週令、一群；5 匹）のそれぞれに前記ユニットペプチド（ $200 \mu\text{g}/\text{マウス}$ ）をフロイントの不完全アジュバント（F I A）と共に腹腔免疫し、2 週間後に初回免疫と同条件で追加免疫した。その 1 週間後に

5 採血し、その血清中のユニットペプチド及び P A c に対する抗体価を、ユニットペプチド或いは P A c をコート抗原として使用した、常法の E L I S A 法により測定した。その結果を表 1 に示す。なお、以下の実験における、各抗原に対する抗体価は、個々のマウスから

10 採血した血液の血清を、それぞれ連続的に 2 倍希釈した標品中の抗体量を、E L I S A 法により、酵素標識抗体を使用して検出し、分析に使用したマイクロタイタープレートの各ウエルについて、マイクロタイタープレートリーダー（マルチスキャン バイクロマテック、ラボシステム社販売）により、 405 nm の吸光度を測定して、その吸光度と、コート抗原を使用していない対照のウエルの吸光度

15 を比較し、その差が 0.1 以上となる血清の最高希釈倍率を求め、平均して、抗体価として表した。また、コンジェニックマウスの種類の名称の後に、そのマウスの M H C クラス I I のハプロタイプの型を括弧内に併記した。

表 1 :

コンジェニックマウスの種類	MHCクラスIIのハプロタイプ	P A c に対する抗体価	ユニットペプチドに対する抗体価
B 1 0 . M	f	19112	35391
B 1 0 . D 2	d	1625	9314
B 1 0 . B R	k	1135	4539
B 1 0 . S M	v	138	75
B 1 0 . S	s	138	75
B 1 0 . Y	pa	75	75
B 1 0 . G	q	75	45
B 1 0 . R I I I	r	40	25

表 1 から明らかなように、マウスの M H C クラス I I (H - 2) のハプロタイプが f 、 d 、或いは、 k 型の B 1 0 . M 、 B 1 0 . D 2 、 B 1 0 . B R の 3 種 のコンジェニックマウスでは、他のタイプ M H C クラス I I (H - 2) のハプロタイプのマウス比較して、ユニットペプチド及び P A c に特異的な抗体の産生が強く誘導された (約 1 0 倍以上) 。このことから、このユニットペプチドには、 H - 2 のクラス I I が d 、 f 、 k 型の複数のハプロタイプのコンジェニックマウスにおいて、抗 P A c 抗体を誘導するための B 細胞エピトープと、抗原提示に必要な、複数の M H C クラス I I のハプロタイプ (H - 2 d , f , k 型) の拘束を受ける複数の T 細胞エピトープとが、共存していることが明らかになった。また、 1 3 残基の短鎖ペプチドからなるユニットペプチド中に、 M H C クラス I I (H - 2 A) の複数種のハプロタイプに同時に応答できる、マルチアグレトープ型の T 細胞エピトープを有するペプチド抗原が存在することは、 1 種類の短いポリペプチドを使用しても、 M H C クラ

スⅠⅠハプロタイプの異なる複数の個体に、効率的に抗体産生を誘導できるＴ細胞エピトープを有するポリペプチドを、人為的に設計できる可能性を示唆している。

5 実験例２：マウスにおけるマルチアグレトープ型Ｔ細胞エピトープの確認

実験例１でユニットペプチドに、マルチアグレトープ型のＴ細胞エピトープの存在が確認されたため、マウスにおけるマルチアグレトープ型Ｔ細胞エピトープとして機能するアミノ酸配列とその位置関係を確認するための実験を以下のようにして行った。ユニットペプチドのアミノ酸残基を順次バリンに置き換えたバリン置換ペプチドを合成し、それらを前述のユニットペプチド応答マウスに免疫することにより、抗体誘導に不可欠のアミノ酸残基をそれぞれ推定した。さらに、推定アグレトープに関与する全てのアミノ酸をバリンで同時に置換した位置限定バリン置換ペプチドをそれぞれ合成し、実験例１と同様の方法、スケジュールで、各コンジェニックマウスを免役し、実験例１と同様に、血清中の抗体価をＥＬＩＳＡを用いて測定し、その免疫による抗体誘導能の検討から、それぞれのＭＨＣクラスⅠⅠのハプロタイプに対応するユニットペプチド抗原上のアグレトープを決定した。その結果を表２にまとめて示す。なお、表２には、各々のＭＨＣクラスⅠⅠのハプロタイプで認識されるユニットペプチド上のアミノ酸のみを表記した。

表 2 :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ユニットペプチドのアミノ酸配列	Thr	Tyr	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	Gln	Tyr	Glu	Aal	Asp	Leu
B10. A (a) のマウスの拘束に関するアミノ酸				Ala			Lys	Gln			Ala		
B10. D2 (d) のマウスの拘束に関するアミノ酸			Glu			Leu	Lys					Asp	Leu
B10. M (f) のマウスの拘束に関するアミノ酸						Leu			Tyr	Glu			Leu
B10. BR (k) のマウスの拘束に関するアミノ酸	Thr	Tyr			Ala			Gln					

表 2 から明らかなように、それぞれの M H C クラス I I のハプロタイプで認識されるために必要な 4 又は 5 個のアミノ酸残基（アグレトープ）が、何れでも、アミノ酸 1 3 残基のユニットペプチド分子内に重複およびシフトして共存しており、ユニットペプチド内に、

5 マルチアグレトープ型 T 細胞エピトープとして、各々の M H C クラス I I のハプロタイプにより認識されるアミノ酸の位置関係が確認された。

実験例 3：マルチアグレトープ型ペプチド抗原の人為的構築

10 前記ユニットペプチドのアミノ酸配列に手を加えることにより、人為的に M H C クラス I I ハプロタイプによる拘束に関するマウスの免疫応答を変化させることが可能か否か検討した。実験例 2 で決定した B 1 0 . D 2 (d) 或いは B 1 0 . M (f) マウスにそれぞれ対応するアグレトープの一部が共存するユニットペプチド分子上の部位（配列表における配列番号 1 のアミノ酸配列を有するユニットペプチドのアミノ末端から 1 0 ~ 1 2 番）のアミノ酸残基を

15 意図的に他のアミノ酸残基と置換した、配列表における配列番号 1 2（以下、「Y Q T E L ペプチド」という。）、配列番号 1 3（以下、「Y E T D L ペプチド」という。）、配列番号 1 4（以下、「Y E T A L ペプチド」という。）、また、配列番号 1（以下、「Y E A D L ペプチド」という。）に記載のアミノ酸配列を有するペプチド、ユニットペプチドのカルボキシル末端にリジン—グルタミン—チロシンをさらに結合した、配列表における配列番号 1 5（以下、「Y E A D L K Q Y ペプチド」という。）に記載のアミノ酸配列を有する

20 ペプチド、及び、ユニットペプチドのアミノ末端に、B 1 0 . S (s) マウスが認識する T 細胞エピトープとして公知の P A c のア

25

ミノ末端から 305 ~ 318 のアミノ酸配列を有する配列表における配列番号 16 に記載のアミノ酸配列を有するペプチド（以下、「P A c (305 ~ 318) 」という。）を連結して、配列表における配列番号 17 （以下、「ユニットペプチドー P A c (305 ~ 318) 」という。）又は上記両ポリペプチドを逆順に連結した配列表における配列番号 18 （以下、「P A c (305 ~ 318) - ユニットペプチド」）に記載のアミノ酸配列を有するペプチドを、それぞれ合成して、これらのポリペプチドを、実験例 1 と同様の、免疫方法、スケジュールで一連の B 10 コンジェニックマウスに免疫し、追加免疫の 2 週間後に、各マウスから採血し、これから血清を分離後、生理食塩水で 512 倍に希釈して、実験例 1 と同様の E L I S A 法で測定し、免疫に使用した各々のポリペプチドに対する各々のコンジェニックマウスにおける抗体産生の誘導程度を、405 nm の吸光度で比較した。その結果を表 3 に示す。また、ユニットペプチドー P A c (305 ~ 318) 或いは P A c (305 ~ 318) - ユニットペプチドで免疫したマウスの血清中のユニットペプチドに特異的な抗体量の測定結果を表 4 に示す。なお、吸光度が、0.1 以上の場合には、希釈した血清中に、ユニットペプチドに対する抗体が存在すると判定した。

表 3 :

コンジュエニクマ ウスの種類	MHCクラス II のハプロ タイプ	ユニットペプチドに対する抗体価 (405nm吸光度)					PAC (305-318)- ユニット ペプチド
		YQTEL ペプチド	YETDL ペプチド	YETAL ペプチド	YEADL ペプチド	YQADLK QY ペプチド	
B10. A	a	0.01	0.01	0.01	0.28	0.29	0.29
B10. D2	d	0.01	0.32	0.32	0.33	0.32	0.30
B10. M	f	0.01	0.12	0.33	0.32	0.32	0.32
B10. BR	k	0.22	0.31	0.30	0.30	0.30	0.30
B10. S	s	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.31
B10. SM	v	0.01	0.01	0.01	0.01	0.32	0.31

表 4 :

コンジェニックマウスの種類	MHCクラス I I のハプロタイプ	ユニットペプチドに対する抗体価	
		ユニットペプチドー P A c (305-318) で免疫	P A c (305-318)ーユニットペプチドで免疫
B 1 0 . D 2	d	7610	28695
B 1 0 . S	s	106	108205
B 1 0 . M	f	59986	108205

表 3 から明らかなように、ユニットペプチドのアミノ酸を意図的にデザインすることにより、Y Q T E L ペプチドで免疫した場合には、B 1 0 . B R (k) 1 種類のみ抗体産生が誘導されたの
 5 に対して、Y E A D L ペプチド（ユニットペプチド）で免疫した場合には、B 1 0 . S (s) 及び B 1 0 . S M (v) を除く 3 種のマウスに同時に抗体の産生が誘導された。このことから、ペプチド中の 1 ~ 3 個のアミノ酸の種類を変えることにより、異なる M H C クラス I I のハプロタイプを有する個体において、そのユニットペ
 10 チドに対する免疫応答性を変化させることができることが確認された。また、Y E A D L K Q Y ペプチドのように、ユニットペプチドのカルボキシル末端にリジンーグルタミンーチロシンを附加することにより、M H C クラス I I のハプロタイプの型の異なる、B
 15 1 0 . S (s) を除く 4 種類のマウスで抗体の産生が誘導された。さらに、表 3 及び表 4 から明らかなように、P A c (3 0 5 ~ 3 1 8) ーユニットペプチドのように、ユニットペプチドのアミノ末端に、このユニットペプチドに不応答マウスである B 1 0 . S (s) が応答することが知られている T 細胞エピトープである P A c (3
 20 0 5 ~ 3 1 8) ペプチドを連結することにより s 型を含む 5 種類の

MHCクラスII型を有する個体で、同時にユニットペプチドに対する抗体が誘導できるマルチアグレトープ型ペプチド抗原となることが確認された。これらのことから、抗原上の複数のMHCクラスIIのハプロタイプによる拘束性に関与するアミノ酸配列の解析を行い、その結果に基づき、個々のMHCクラスIIのハプロタイプの拘束を受けるアミノ酸配列を重複させたアミノ酸配列を有するペプチドを人為的にデザインすることにより、抗原に対する抗体産生を効率的に誘導でき、複数のMHCクラスIIのハプロタイプの拘束を同時に受けることができる重複型のマルチアグレトープ型T細胞エピトープの構築が可能であることが確認された。また、複数のT細胞エピトープをタンデムに結合することにより調製したクラスター型T細胞エピトープも、重複型エピトープと同様に、複数のMHCクラスIIのハプロタイプの拘束を受ける個体に対する、抗体産生を効率よく誘導するT細胞エピトープとなることが確認された。また、表4から明らかなように、PAc(305~318)とユニットペプチドを連結したポリペプチドで免疫したマウスにおける、ユニットペプチドに対する抗体の産生は、免疫に使用したポリペプチドのカルボキシル末端側にユニットペプチドを連結した場合の方が、アミノ末端側に連結したものよりも、抗体産生の増強が強い傾向が認められた。

実験例4：ヒト用マルチアグレトープ型ペプチド抗原の人為的構築

上記実験例3の結果に鑑み、MHCクラスIIハプロタイプの拘束に起因するヒトによる免疫原性の強弱の解決策として、公知のヒトのMHCクラスIIハプロタイプ(HLA-DR)拘束に対するT細胞エピトープの拘束モチーフ(アグレトープ配置)に基づき、

配列表における配列番号 19 に記載のアミノ酸配列を有する、複数の MHC クラス II のハプロタイプの拘束に対して同時に応答可能な重複・シフト型のマルチアグレトープ型ペプチド (Overlapping Multiagretope Peptide: 以下の実験では、このペプチドを「OMP」と略記する。) を構築した。なお、具体的なデータは示さないが、このポリペプチドは、マウスにおいても、T 細胞のマルチアグレトープとしての機能を有することが確認された。なお、表 5 として、ヒトの MHC クラス II である HLA-DR の各々のハプロタイプにより認識される OMP 上のアミノ酸のみを示した。

表 5 :

[illegible]

実験例 5：ポリペプチドの特異抗体産生の増強に及ぼすリンカーペプチドの影響

実験例 3 で調製した短鎖のユニットペプチドでは免疫原性が弱く、その免疫原性の増強のために、ポリペプチドをタンデムに連結
5 することを検討したものの、このままでは、連結により生じた新たなエピトープに対する抗体産生も増強されることを考慮し、B 細胞エピトープが正確に提示されることを目的として、T 細胞エピトープを含むポリペプチドと B 細胞エピトープを含むポリペプチドの間に、抗原提示細胞で抗原のプロセッシングに関与するエンドソーム内プロテアーゼ（カテプシン B）の認識配列である KK をリンカーペプチドとして挿入し、その抗体産生の増強に対する影響を確認
10 する実験を以下のように行った。実験例 4 で調製した OMP はマウスの T 細胞エピトープのアミノ酸配列も含んでいることから、この OMP と、B 細胞エピトープを含むペプチドとなるユニットペプチドとの間に、KK のアミノ酸を挿入した、配列表における配列番号
15 20（以下、「OMP-KK-ユニットペプチド」と略記する。）、及び、配列番号 21（以下、「ユニットペプチド-KK-OMP」と略記する。）記載のアミノ酸配列からなる 2 種類のポリペプチドを合成し、実験例 1 と同様の方法により、BALB/c マウスの腹腔内に免疫し、実験例 1 と同様に、ELISA により、その血清中の、OMP、免役したポリペプチド、及び、PAc に対する抗体価
20 を測定した。その結果を表 6 に示す。

表 6 :

抗原として使用したポリペプチド	PACに対する抗体価	免疫したペプチドに対する抗体価	OMPに対する抗体価
OMP-KK-ユニットペプチド	836462	782685	1737
ユニットペプチド-KK-OMP	961	29921	1211

表 6 から明らかなように、リンカーペプチドの KK を挟んで T 細胞エピトープである OMP をポリペプチドのアミノ末端側に、B 細胞エピトープであるユニットペプチドをカルボキシル末端側に位置させることにより、効率の良い抗体の誘導が認められた。また、この傾向は、実験例 3 でもマウスの系統にかかわらず同様であり、とりわけ、ユニットペプチドのアミノ酸配列には T 細胞エピトープが存在せず、PAC (305 ~ 318) のアミノ酸配列にのみに T 細胞エピトープが存在する B10.S (s) においては顕著であった (表 4 参照)。以上から、リンカーペプチドを挟んでアミノ末側のペプチドが T 細胞エピトープとして、またカルボキシル末側のペプチドが B 細胞エピトープとしてより効果的に認識されることが明らかとなった。

15

実験例 6 : 細胞接着分子の細胞結合モチーフ附加によるペプチド抗原の鼻腔免疫における免疫原性の増強

配列表における配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドは抗う蝕活性を有する抗体を産生誘導することができるが、この 2 分子をリジン-リジンからなるリンカーで連結したポリペプチド (配列表における配列番号 22 : ユニットペプチド-KK-ユニットペプチド、以下、「ジユニットペプチド」という。) は、注射 (皮下或いは腹腔) による免疫においては、より効果的に抗体産生誘導

20

が可能であり、免疫アジュバントを必要しない。しかしながら、経鼻免疫においては十分な抗体誘導能を示さないので、免疫アジュバントの同時投与が必要である。そこで、経鼻免疫における抗原性を増強することを目的として、ジュニットペプチドを粘膜面に長く留めるために、インテグリンファミリー等を介しての細胞接着性が証明されているタンパク質（フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン等）のインテグリン結合モチーフや他の細胞接着モチーフのアミノ酸配列を当該ペプチドに附加することによる免疫原性に対する影響を確認するための実験を以下のように行った。すなわち、前記

5 ジュニットペプチドの、アミノ末端側に、細胞接着アミノ酸配列としてRGD、RED、LDV、PHSRN、RKK、DGEA及びYIGSR、IKVAV、IRVVM、及びRFYVVMWKから選ばれる何れか1種又は2種を連結したポリペプチドを合成した。また、対照として、ジュニットペプチドのみ、及び、このポリペ

15 チドに、単独では細胞接着能が無いとされているカドヘリン関連の配列表における配列番号23（以下、「DRE」と略記する。）、配列番号24（以下、「DED」と略記する。）、配列番号25（以下、「HAV」と略記する。）に記載のアミノ酸配列を有するペプチドを連結したポリペプチドを合成した。一群5匹のBALB/cマウ

20 ス（日本SLC株式会社、雌、5週令）に、リン酸緩衝生理食塩水（以下、「PBS」と略記する。）または蒸留水に50 μ g / 4 μ lの濃度で無菌的に溶解した各種ポリペプチド溶液を、片鼻2 μ l、計4 μ l（50 μ g / 個体 / 回）、鼻腔から滴下により吸入させた。なお、さらに、陰性対照として、ジュニットペプチドのみを経鼻投

25 与した群、及び、陽性対照として、ジュニットペプチドと共にCT1 μ gを投与した群を設定した。また、ユニットペプチドーKKー

ユニットペプチド及びこれにRGDを連結したポリペプチドは、腹腔内投与も行った。初回免疫の2週間後に、追加免疫として、各々初回と同種類、同量のポリペプチドを同条件下に経鼻的に投与した。さらに、その2週間後に、各々前回と同一種類、同一量のポリペプチドを同条件下で投与し、その一週後、マウスの血清中の、PAC、ジユニットペプチド、CT、ジユニットペプチドに細胞接着アミノ酸配列を附加したポリペプチドの各々に対する抗体価を、実験例1と同様のELISA法によりそれぞれ測定した。また、RGD或いはYIGSRを附加したポリペプチドについては、これらのペプチドが、抗体産生の増強に関与していることを確認するために、その阻害剤として知られている、RGDS（配列表における配列番号26）或いはYIGSR（配列表における配列番号8）の過剰量を同時に添加して、同様に免疫を行った。その結果を表7に示す。なお、RGD、RED、LDV、PHSRN、RKK、DGEA及びYIGSR、IKVAV、IRVVM、及びRFYVVMWKから選ばれる何れか1種又は2種以上を附加したジユニットペプチドで免疫したマウスでは、何れも、ユニットペプチドに対する抗体の産生が増強され、DRE、DED、或いは、HAV附加したジユニットペプチドで免疫したマウスでは何れも、ユニットペプチドに対する抗体の産生が増強されなかったので、表7では、ジユニットペプチド、配列表における配列番号27（以下、「RGD-ジユニットペプチド」という。）、配列番号28（以下、「RED-ジユニットペプチド」という。）、配列番号29（以下、「YIGSR-ジユニットペプチド」という。）、配列番号30（以下、「DED-ジユニットペプチド」という。）、配列番号31（以下、「HAV-ジユニットペプチド」という。）に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドで

免疫した結果のみを示す。

表 7 :

抗原として使用したポリペプチド	投与経路	PACに対する抗体価
ジュニットペプチド	経鼻投与	640
CT + ジュニットペプチド		32768
RGD - ジュニットペプチド		5069
RGDS + RGD - ジュニットペプチド		256
RED - ジュニットペプチド		1395
YIGSR-ジュニットペプチド		1195
YIGSR + YIGSR-ジュニットペプチド		235
DED - ジュニットペプチド		544
HAV - ジュニットペプチド		320
ジュニットペプチド	腹腔内投与	312
RGD - ジュニットペプチド		2352

表 7 から明らかなように、ジュニットペプチドを単独で経鼻投与したのでは、ほとんどジュニットペプチドに対する抗体産生の誘導が認められないのに対して、インテグリン結合モチーフの R G D、R E D、或いは、ラミニン結合タンパク質に対するラミニン分子上の結合モチーフの Y I G S R を附加した R G D - ジュニットペプチド、R E D - ジュニットペプチド、或いは、Y I G S R - ジュニットペプチドを経鼻投与した場合には、抗体産生の増強効果が認められた。なお、その際に、インテグリンへの結合阻害剤である R G D S や Y I G S R の短鎖ペプチドを過剰量共存させた場合には、P A C に特異的な抗体の産生が抑制された。この結果は、R G D や Y I G S R などの細胞接着分子のモチーフの附加が、ポリペプチドのもつ抗体産生の誘導能をさらに増強する効果があること、その効果は、ジュニットペプチドが粘膜細胞膜に存在するインテグリンに結合することにより発揮することが示唆された。

実験例 7 : 経粘膜投与ペプチドワクチンの抗体産生増強に対する細胞接着分子の影響.

実験例 6 のジュニットペプチドで証明されたインテグリン結合
5 モチーフの附加の及ぼす、他のペプチド抗原による抗体産生の増強への影響、及び、インテグリン結合モチーフの附加部位の違いによる抗体産生増強への影響を調べる実験を、以下のように行った。実験例 5 で P A c に対する特異抗体の産生増強能の高いことが確認された、OMP-KK-ユニットペプチドの OMP、或いは、ユ
10 ャニットペプチドのアミノ末端側又はカルボキシル末端側に、実験例 6 で、ポリペプチドの抗体産生の誘導の増強作用が示唆された細胞接着分子のインテグリン結合モチーフとして知られている RGD を、挿入して、「RGD-OMP-KK-ユニットペプチド」(配列表における配列番号 32)、「OMP-RGD-KK-ユ
15 ニットペプチド」(配列表における配列番号 33)、「OMP-KK-RGD-ユニットペプチド」(配列表における配列番号 34)、「OMP-KK-ユニットペプチド-RGD」(配列表における配列番号 35)という配列を有する合計 4 種類のポリペプチドを合成した。なお、陽性対照として、経粘膜投与でアジュバント活性を有することが既
20 に知られている CT を使用した。これらのポリペプチド或いはポリペプチドと CT の混合液を使用して、実験例 6 と同じ方法により、B10 マウスを免疫して、その抗体産生の増強を誘導する効果の有無を判定した。その結果を表 8 に示す。

表 8 :

抗原として使用したポリペプチド	PACに対する抗体価	免疫したペプチドに対する抗体価	OMPに対する抗体価
OMP-KK-ユニットペプチド	32	128	32
CT+ OMP-KK-ユニットペプチド	1454	1063	14
RGD-OMP-KK-ユニットペプチド	11544	11514	32
OMP-RGD-KK-ユニットペプチド	26241	24370	16
OMP-KK-RGD-ユニットペプチド	169	723	16
OMP-KK-ユニットペプチド-RGD	1981	9483	16

表 8 から明らかなように、OMP-KK-ユニットペプチドに RGD を挿入すると PAC に対する抗体産生が強く増強された。特に、

5 RGD を OMP のアミノ末端側或いはカルボキシル末端側に挿入した場合に、言い換えれば、リンカーを挟んで N 末端側に挿入した場合に、目的とする抗体の産生量はアジュバントとして CT を用いた場合よりも顕著に強く増強され、かつ、誘導される抗体のほとんどが PAC と反応する抗体であることが確認された。一方、リンカー

10 を挟んで C 末端側に挿入した場合、誘導される抗体の多くは、RGD 配列を含むペプチド部分由来と反応する抗体であることが確認された。

これらのことから、アジュバント非存在下における経鼻免疫においてもリンカーを挟んでアミノ末側のペプチドが T 細胞エピトープとして、またカルボキシル末側のペプチドが B 細胞エピトープとしてより効果的に認識され、目的とする B 細胞エピトープに特異的な抗体産生を効率的に増強し、しかも、リンカーを挟んでアミノ末端側に RGD 配列を附加することにより、産生される抗体のほとんどを PAC のみと反応する抗体とすることができることが明か

15 になった。

20

実験例 8 : 経粘膜投与ペプチドワクチンの基本デザインの普遍性

実験例 7 で調製した R G D - T 細胞エピトープ - K K - B 細胞エピトープで構成されたポリペプチドの T 細胞エピトープと B 細胞エピトープの何れか一方を、O M P 或いはユニットペプチド以外のポリペプチドで置き換えた場合の、B 細胞エピトープに対する抗体産生の増強への影響を調べる実験を以下のように行った。T 細胞エピトープとして、種を問わず幅広い M H C クラス I I ハプロタイプの拘束性がすでに報告されている、配列表における配列番号 3 6 記載の H I V I I I B g p 1 2 0 由来のマルチアグレトープ型 T 細胞エピトープである T 1 ペプチド (ジェイ・ディー・アーラーズ (A h l e r s J . D .) 著、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ (P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l Academy of Sciences USA)、第 9 4 巻、第 2 0 号、1 0 8 5 6 乃至 1 0 8 6 1 頁 (1 9 9 7 年) 参照。)(以下、「T 1」と略記する。) を使用し、B 細胞エピトープとして B A L B / c マウスにおいて卵白アルブミン (以下、「O V A」と略記する。) に対する抗体を誘導することが知られている、配列表における配列番号 3 7 記載のアミノ酸配列からなる O V A 由来の 1 4 残基のペプチド (以下、「O V A p」と略記する) (ディー・エフ・ハント (H u n t D . F .)、サイエンス (S c i e n c e)、第 2 5 6 巻、1 8 1 7 乃至 1 8 2 0 頁 (1 9 9 2 年) 参照。) を使用して、「R G D - O M P - K K - O V A p」(配列表における配列番号 3 8)、或いは、「T 1 - R G D - K K - ユニットペプチド」(配列表における配列番号 3 9) からなるポリペプチドを合成した。ま

た、対照として、「OMP-KK-OVA_p」（配列表における配列番号40）又は「T1-KK-ユニットペプチド」（配列表における配列番号41）を用意した。これらのポリペプチドを、各々、実験例6と同様の方法で、BALB/cマウスに鼻腔免疫を行った。

5 その結果を表9に示す。

10

15

20

25

表 9 :

抗原として使用したポリペプチド	OMPに対する 抗体価	免疫したペプチ ドに対する 抗体価	OVAに対する 抗体価	CTに対する 抗体価
OMP-KK-OVAp	108	1589	1656	測定せず
RGD-OMP-KK-OVAp	235	5080	11692	
CT + OMP-KK-OVAp	7319	21310	25654	3656835
抗原として使用したポリペプチド	T1に対する 抗体価	免疫したペプチ ドに対する 抗体価	PACに対する 抗体価	CTに対する 抗体価
T1-KK-ユニットペプチド	103	160	320	測定せず
T1-RGD-KK-ユニットペプチド	107	1707	1579	
CT + T1-KK-ユニットペプチド	69	1152	176	139264

表 9 から明らかなように、RGD-OMP-KK-OVA_p、或いは、T1-RGD-KK-ユニットペプチドからなるポリペプチドを経鼻免疫したマウスでは、OVA 或いは PA_c 特異的な抗体の産生が増強された。すなわち、RGD を附加したポリペプチドで免疫した場合には、RGD を附加していないポリペプチドで免疫した場合よりも強い抗体産生の増強が認められた。

実験例 9 : 本発明のポリペプチドによる他の抗原の抗体産生増強効果

通常、アジュバントとして用いる CT は抗原性が強く、経鼻的に投与すると、CT に対する抗体が誘導されるだけでなく、CT と同時に経粘膜投与した、CT 以外の抗原に対する抗体産生を増強することが知られている。一方、実験例 7 及び実験例 8 から明らかなように、RGD-OMP-KK-ユニットペプチド、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、RGD-OMP-KK-OVA_p 或いは T1-RGD-KK-ユニットペプチドからなる本発明のポリペプチドは、CT を免疫アジュバントとして用いなくても、それらの単独の経鼻投与で、それぞれのポリペプチドに特異的な抗体の産生が誘導された。さらに、本発明のポリペプチドが、他の抗原に対して抗体産生増強作用を示すかどうかの確認のための実験を以下のように行った。

<牛血清アルブミンの経鼻投与に及ぼす各種ポリペプチド影響>

牛血清アルブミン（以下、「BSA」と略記する。）4 μ g と、ジユニットペプチド 1 μ g、RGD-ユニットペプチド-KK-ユニットペプチド 1 μ g、OMP-KK-ユニットペプチド 1 μ g、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド 1 μ g、OMP-KK-O

V A p 1 μ g、R G D - O M P - K K - O V A p 1 μ g 或いは C T 2 μ g の何れかを混合した生理食塩水溶液を調製し、各々、実験例 6 と同様の方法で、B A L B / c マウスに鼻腔免疫を行い、血中の抗体価を測定した。その結果を表 1 0 に示す。なお、測定は、B S A、B S A と共に投与したペプチド、及び、C T に対する抗体について行った。

＜卵白アルブミンの経鼻投与に及ぼす各種ポリペプチド影響

O V A 4 μ g と O M P - R G D - K K - ユニットペプチド 1 μ g、O M P - R G D - K K - O V A p 1 μ g 或いは C T 2 μ g の何れか 1 種を混合した生理食塩水溶液を調製し、各々、実験例 6 と同様の方法で、B 1 0 . D 2 マウス或いは B A L B / c マウスに鼻腔免疫を行い、血中の抗体価を測定した。その結果を表 1 0 に示す。なお、測定は、O V A、O M P - R G D - K K - O V A p、及び、C T に対する抗体について行った。

15

20

25

表 10 :

抗原として使用したポリペプチド		CTに対する 抗体価	BSAに対する 抗体価	免疫したペプチ ドに対する 抗体価
BSA		測定せず	32	測定せず
CT + BSA		1887437	838861	
ジユニットペプチド+ BSA		測定せず	179	83
RGD-ジユニットペプチド+ BSA			6912	154
RGDS+ RGD-ジユニットペプチド+ BSA			576	128
OMP-KK-ユニットペプチド+ BSA			20480	1152
OMP-RGD-KK-ユニットペプチド+ BSA			109227	213
OMP-KK-OVAp + BSA			1441792	224
RGD- OMP-KK-OVAp + BSA			1527887	256
抗原として使用したポリペプチド		CTに対する 抗体価	OVAに対する 抗体価	免疫したペプチ ドに対する 抗体価
B10. D2 マウス	OVA	測定せず	203	測定せず
	CT + OVA	681574	24576	
	OMP-RGD-KK-ユニットペプチド+ OVA	測定せず	10242	24
BALB/C マウス	OVA		16	測定せず
	CT + OVA		4096	
	OMP-RGD-KK-ユニットペプチド+ OVA	測定せず	2176	26

表 10 から明らかなように、BSA 或いは OVA を単独で経鼻投与しても、血液中には、これらのポリペプチドに対する抗体はほとんど誘導されなかった。これに対して、BSA 又は OVA と、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVAp 又は RGD-OMP-KK-OVAp の何れか 1 種とを同時に投与したマウスでは、BSA 或いは OVA に対する強い抗体の産生が誘導された。また、BSA と RGD-ユニットペプチド-KK-ユニットペプチド又は OMP-KK-ユニットペプチドとを同時に投与した場合にも、BSA 又は OVA に対する抗体の産生が誘導されるものの、増強の程度は、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド

ド、OMP-KK-OVA_p又はRGD-OMP-KK-OVA_pと同時に投与した場合よりも低かった。BSA又はOVAと、CTとを投与しした場合にも、BSA又はOVAと、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVA_p又はRGD-OMP-KK-OVA_pの何れか1種を同時に投与した場合と同程度の抗体産生が認められた。しかしながら、実験に使用した1 μ gのOMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVA_p或いはRGD-OMP-KK-OVA_pの何れかを同時に投与した場合には、これらのペプチドに対する抗体の産生は、わずかであったのに対して、2 μ gコレラトキシンを同時に投与した場合には、CTに対する抗体も強く誘導された。これらのことから、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVA_p或いはRGD-OMP-KK-OVA_pは、自己に対する抗体産生を誘導する量以下の量、あるいは、少量の自己抗体を誘導する量を、他の抗原と同時経鼻投与することにより、同時に投与した自己以外の抗原の抗体産生を誘導する免疫アジュバントとして使用できることが確認された。

以上の実験結果から、種々のT細胞エピトープと種々のB細胞エピトープを組み併せて、その間にKKなどのプロテアーゼの認識配列をリンカーペプチドとして挿入し、さらに、このペプチドに細胞接着分子のモチーフを附加したポリペプチドは、B細胞エピトープ或いはそれを含む抗原に対する抗体の産生を増強することのできることが明らかとなった。また、これらのポリペプチドは、経鼻のような経粘膜投与でも免疫アジュバントを併用することなしに、投与したポリペプチドの中のB細胞エピトープに対する抗体を、効率よく誘導でき、しかも、それ以外の部位に対する不要な抗体の産生

がほとんどないため、特異的な抗体産生の誘導剤、或いは、抗体産生の増強剤として使用できることが確認された。また、これらのポリペプチドを投与された生体では、免疫に使用したB細胞エピトープが由来する抗原性タンパク質を認識する抗体が効率よく産生されることから、本発明のポリペプチドは、経鼻免疫をはじめとする経粘膜免疫において、免疫アジュバントを必要とせずに、目的とする感染防御抗体や毒素、酵素類の活性の中和抗体やアレルゲンに対する抗体などの種々の抗原に対す抗体の誘導が可能であることを示しており、しかも、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束された個体に、抗体産生を効率的に誘導できることから、感染防御などの目的で使用する、経鼻粘膜免疫用ペプチドワクチンとして使用できることが示された。また、これらポリペプチドは、他の抗原と同時に粘膜免疫されたとき、免疫アジュバントとして機能することも明かとなった。

以下に、実施例で、本発明のポリペプチドについて具体的に説明する。しかし、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例1：PAcに対する抗体の産生の増強用の組成物

実験例7の方法に準じて調製した、RGD-OMP-KK-ユニットペプチド、RGD-OMP-KK-ユニットペプチド、RGD-OMP-KK-ユニットペプチド及びOMP-KK-ユニットペプチド-RGDの何れか1種を100 μ g/mlと α , α -トレハロース（試薬級 株式会社林原生物化学研究所販売）を40%となるように、蒸留水に溶解し、常法により滅菌してシラップ剤を得た。これを滅菌バイアル瓶に2mlずつ分注し、密閉して、ポリペ

プチド含有シラップ剤を調製した。本品は、安定性に優れ、広範な MHC クラス II のハプロタイプに拘束されるため、多くのヒトや動物で、経鼻、或いは、経口的に投与することにより、う蝕予防活性を有する抗体産生を効率的に増強するワクチン効果を発揮することができる。また、本品は、経粘膜や経皮などの投与により、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

実施例 2 : P A c に対する抗体の産生の増強用の組成物

安定剤として、1% (w/v) のショ糖を含む生理食塩水に、実験例 7 の方法に準じて調製した R G D - T 1 - K K - ユニットペプチドを、各々 10 μ g/ml、100 μ g/ml、又は、1,000 μ g/ml となるように溶解し、ろ過滅菌した。これを滅菌バイアル瓶に 1 ml ずつ分注し、常法により、凍結乾燥して、密閉し、ポリペプチド含有製剤を調製した。本品は、安定性に優れた、う蝕予防効果に優れた、経粘膜摂取或いは注射用の製剤である。本品は、何れも、注射用蒸留水 1 ml に完全に溶解して使用する。また、本品は、何れも、安定性に優れ、広範な MHC クラス II のハプロタイプに拘束されるため、多くのヒトや動物で、経鼻、或いは、経口的に投与することにより、う蝕予防活性を有する抗体産生を効率的に増強するワクチン効果を発揮することができる。また、本品は、経粘膜や経皮などの投与により、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

実施例 3 : ポリペプチド含有組成物の毒性試験

実施例 1 或いは、実施例 2 で調製したポリペプチドを 12.5 mg / ml となるように、0.5% のショ糖を含有する生理食塩水で希釈し、これを、生後 5 週令の DDY 系の雄マウスに、常法により経口、腹腔内又は、筋肉内に投与して、LD₅₀ を検討した。これらの標品は何れも、LD₅₀ がポリペプチド質量に換算して 100 mg / kg マウス体重以上であり、このことは、本発明のポリペプチドが、ヒトや動物に投与しても、毒性のない、安全な製剤であることを示している。

10 実施例 4 : HIV に対する抗体産生の増強用の組成物

T 細胞エピトープとして OMP、T1、HLA-DR1、2、3、4、5、6、7、8、9、51、52、53 に結合することが報告されている、配列表における配列番号 42 記載の HIV-1 由来の gag 298-312 ペプチドと相同のアミノ酸配列を有するペプチド、又は、配列表における配列番号 43 記載の HIV-1 由来の pol 596-610 (シー・シー・ウイルソン (Wilson, C. C.) 著、ジャーナル・オブ・バイロロジー (Journal of Virology, 75, 4195-4207 (2001) 参照。) と相同のアミノ酸配列を有するペプチドから選ばれる何れか 1 つを用い、RGD をそのアミノ又はカルボキシル末端に配し、KK からなるリンカーペプチドをはさんでカルボキシル末端側に HIV 中和抗体を誘導するための B 細胞エピトープとして、配列表における配列番号 44 に記載のアミノ酸配列からなる HIV の gp120 蛋白の V3 の loop ペプチドと相同のペプチド (ビー・エフ・ヘイネス著 (Haynes, B. F.)、ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (The Journal of Immunology

log y)、第151巻、1646乃至1653頁、(1993年))
を配したポリペプチドを調製した。これらのペプチドから選ばれる
何れか1種又は2種を各々150 μ g/mlとマンニトール10
0mg/ml含有する生理食塩水溶液を調製した。これらを、5m
5 l容のバイアル瓶に1ml/バイアルとなるように分注し、常法に
より凍結乾燥した。本品は、広範なMHCクラスIIのハプロタイ
プに拘束されているため、ヒトに経粘膜や経皮などの投与により、
多くのヒトでHIVに特異的な抗体の産生を効率よく増強するこ
とができることから、HIV感染の広がり、或いは、HIV感染者
10 の発症を遅延させるワクチンの目的で有利に使用できる。また、本
品は、経粘膜投与などにより、これとともに投与した、他の抗原の
抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

15 実施例5：インフルエンザウイルスに対する抗体の産生増強用の組 成物

T細胞エピトープとしてOMP、T1、配列表における配列番号
42及び配列番号43記載のアミノ酸配列を有するペプチドから
選ばれる何れか1つを用い、RGD或いはYIGSRをそのアミノ
又はカルボキシル末端に配し、KKリンカーペプチドをはさんでカ
20 ルボキシル末端側にインフルエンザウイルスの中和抗体を誘導す
るためのB細胞エピトープとして、配列表の配列番号45記載のイ
ンフルエンザウイルスのヘムアグルチニン(HA)蛋白アミノ末端
からの91~108番目のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を
有するペプチド(ティー・ベンーイエディディア著(Ben-Ye
25 didia, T.)、モレキュラー・イムノロジー(Molecular
Immunology)、第39巻、323乃至331頁、

(2002年))を配したペプチドワクチンを、常法により合成した。これらのポリペプチドから選ばれる何れか1種又は2種を各々75 μ g/mlとヒトアルブミン0.5 mg/ml含有する生理食塩水溶液を調製した。これらを、5 ml容のバイアル瓶に1 ml/バイアルとなるように分注し、常法により凍結乾燥した。本品は、
5 広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されるため、多くのヒトや動物で、経粘膜や経皮などで投与することにより、インフルエンザウイルスに特異的な抗体の産生を効率よく増強することができるワクチン効果を有することから、インフルエンザウイルスの
10 感染を防御することができる。また、本品は、経粘膜投与などにより、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

実施例6：パピローマウイルスワクチン

15 T細胞エピトープとしてOMP、T1、配列表における配列番号42及び配列番号43記載のアミノ酸配列を有するペプチドから選ばれる何れか1つを用い、RGDをそのアミノ末端又はカルボキシル末端に配し、KKリンカーペプチドをはさんでカルボキシル末端側にヒトパピローマウイルスの中和抗体を誘導するためのB細胞
20 エピトープとして、配列表における配列番号46記載のL2：蛋白由来の部分アミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するペプチド(ケイ・カワナ(Kawana, K.)著、ワクチン(Vaccine)、第19巻、1496乃至1502頁、(2001年))を配したポリペプチドワクチンを調製した。これらのペプチドから選
25 ばれる何れか1種又は2種を各々200 μ g/mlとゼラチンを0.25 mg/ml含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液を調製した。

これらを、5 ml 容のバイアル瓶に 0.5 ml / バイアルとなるように分注し、常法により凍結乾燥した。本品は、広範な MHC クラス II のハプロタイプに拘束されるため、ヒトに経粘膜や経皮などの投与により、多くのヒトでパピローマウイルスに特異的な抗体の

5 産生を効率よく増強することができることから、ヒトパピローマウイルスの感染を防御できる。また、本品は、経鼻投与などの経粘膜により、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

10 実施例 7 : OVA 抗体産生用組成物

実験例 8 の方法で調製した、RGD-OMP-KK-OVA_p のアミノ酸配列を有するポリペプチドを 100 μ g / ml と α , α -トレハロース (試薬級、株式会社林原生物化学研究所販売) を 40% となるように、蒸留水に溶解し、常法により滅菌してシラップ状物を

15 得た。これを滅菌バイアル瓶に 2 ml ずつ分注し、密閉して、ペプチドワクチン含有シラップを調製した。本品は、安定性に優れ、動物に、経鼻、或いは、経口的、経皮的などに投与することにより、OVA に対する抗体を効率的に増強することができる。また、本品は、経鼻投与などにより、これとともに投与した、他の抗原の抗体

20 産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

実施例 8 : インフルエンザワクチンの抗体産生増強用の組成物

生理食塩水 1 ml あたり、市販のインフルエンザ HA ワクチン (藤沢薬品工業株式会社販売) 4 μ g あるいは HA や M 蛋白質などのウイルス表層抗原性タンパク質と RGD-OMP-KK-OVA_p 又は RGD-OMP-KK-ユニットペプチド 1 μ g とを含

25

有する標品を調製した。これを、滅菌バイアル瓶に0.5mlずつ分注し、密閉した。本品は、ウイルス表層抗原性タンパク質とRGD-OMP-KK-OVA_p又はRGD-OMP-KK-ユニットペプチドのもつ免疫アジュバント作用により、そのままでは、経粘膜投与しても抗体産生を誘導することのできないインフルエンザワクチンの経鼻などの経粘膜投与による抗体産生を増強するので、本品を、2週おきに3回ないし4回鼻腔に投与することにより、インフルエンザの感染を防御する抗体の産生を増強することができるワクチンとして使用することができる。

10

実施例9：スギ花粉症経口減感作治療用組成物

T細胞エпитープとしてOMP、T1、配列表における配列番号42及び配列番号43記載のアミノ酸配列を有するペプチドから選ばれる何れか1つを用い、RGDをそのアミノ末端又はカルボキシル末端に配し、KKリンカーペプチドをはさんでカルボキシル末端側にスギ花粉アレルゲン抗体を誘導するためのB細胞エпитープとして、Cryj1のB細胞エпитープであるVHPQDGDA（ワイ・タムラ（Tamura, Y.）著、インターナショナル・アーカイブズ・オブ・アレルギー・アンド・イムノロジー（International Archives of Allergy and Immunology）、第123巻、第3号、228乃至235頁、（2001年））及びCryj2のB細胞エпитープであるKWVNGREI（ワイ・タムラ（Tamura, Y.）著、クリニカル・アンド・エクスperimentalアレルギー（Clinical and Experimental Allergy）、第33巻、第2号、211乃至217頁、（2003年））

20

25

をKKで連結した配列表における配列番号47記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを配し、これらのペプチドから選ばれる何れかを各々200 μ g/mlとゼラチンを0.25mg/ml含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液を調製し、スギ花粉症減感作治療用の組成物を得た。本品は、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されるため、ヒトに経粘膜や経皮などの投与により、多くのヒトで粘膜投与により、スギ花粉アレルゲンCryj1及びCryj2に特異的なIgG抗体を優位に産生することから、経口投与によるスギ花粉症経口減感作治療薬として有用である。

10

産業上の利用可能性

以上説明したとおり、本発明は、特定の抗原ペプチドを含み、目的とする抗原エピトープに対する特異的な抗体の産生を、免疫アジュバント非存在下においても特異的に増強するポリペプチド及其のポリペプチドを含有する組成物に関するものである。しかも、本発明のポリペプチドは、免疫アジュバントを用いる必要もなく、また、経鼻投与や経口投与などの経粘膜投与で使用できることから、注射による経皮投与などに比して、簡易かつ安全な、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されるため、多くのヒトを含む哺乳動物や鳥類、爬虫類、魚類などの抗体産生を行う動物用のワクチン或いは特異抗体産生の増強用の抗原として使用することができる。また、本発明のポリペプチドは、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとして使用することもできる。

25

請 求 の 範 囲

1. アミノ末端側にT細胞エピトープのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有し、リンカーペプチドをはさんで、そのカルボキシ末端側にB細胞エピトープのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有するペプチド内に、1種又は2種以上の細胞接着分子の細胞結合モチーフのアミノ酸配列を1種又は2種以上有することを特徴とするポリペプチド。
2. リンカーペプチドが、リジンーリジン、リジンーアルギニン及びアルギニンーアルギニンからなるジペプチドから選ばれる1種又は2種以上で構成されていることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のポリペプチド。
3. 細胞接着分子の細胞結合モチーフが、配列表における配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10及び配列番号11記載のアミノ酸配列を有するペプチドから選ばれる1種又は2種以上であることを特徴とする請求の範囲第1項又は第2項記載のポリペプチド。
4. 細胞接着分子の細胞結合モチーフが、インテグリンファミリー結合モチーフから選ばれる1種又は2種以上であることを特徴とする請求の範囲第1項又は第2項記載のポリペプチド。
5. T細胞エピトープが、マルチアグレトープ型であることを特徴とする請求の範囲第1項、第2項、第3項又は第4項記載のポリペプチド。
6. B細胞エピトープが、疾患の原因となる抗原性タンパク質由来であることを特徴とする請求の範囲第1項、第2項、第3項、第

4 項又は第 5 項に記載のポリペプチド。

7. 疾患の原因となる抗原性タンパク質がストレプトコカス・ミ
ュータンス セロタイプ C 菌の表層蛋白質抗原、H I V タンパク質、
インフルエンザウイルスタンパク質、パピローマウイルスタンパク
5 質、オブアルブミン及びスギ花粉抗原から選ばれる 1 種又は 2 種以
上であることを特徴とする請求の範囲第 6 項に記載のポリペプチ
ド。

8. 請求の範囲第 1 項、第 2 項、第 3 項、第 4 項、第 5 項、第 6
項又は第 7 項に記載のポリペプチドをコードする D N A 又は R N
10 A。

9. 請求の範囲第 8 項に記載の D N A を導入した微生物又は動植
物。

10. 請求の範囲第 1 項、第 2 項、第 3 項、第 4 項、第 5 項、第 6
項又は第 7 項に記載のポリペプチド及び製剤学的に許容しうる製
15 剤用添加剤を 1 種又は 2 種以上含有することを特徴とする組成物。

11. さらに抗原性タンパク質を含有することを特徴とする請求の
範囲第 10 項に記載の組成物。

12. 請求の範囲第 1 項、第 2 項、第 3 項、第 4 項、第 5 項、第 6
項又は第 7 項に記載のポリペプチド、請求の範囲第 8 項に記載の D
20 N A 又は R N A、請求の範囲第 9 項に記載の動植物又は微生物、又
は請求の範囲第 10 項又は第 11 項に記載の組成物を生体に投与
又は摂取することによる抗体産生方法。

13. 経粘膜投与又は摂取による請求の範囲第 12 項に記載の方法。

14. 疾患の予防又は治療のために行なわれる請求の範囲第 12 項
25 又は第 13 項記載の方法。

15. 請求の範囲第 1 項、第 2 項、第 3 項、第 4 項、第 5 項、第 6

項又は第 7 項に記載のポリペプチドを免疫アジュバントとして用いることを特徴とする抗原性タンパク質に対する抗体産生を増強する方法。

1/12

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Polypeptide

<130> 101006

<160> 47

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

1

5

10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Arg Gly Asp

1

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 3

Arg Glu Asp

1

<210> 4

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 4

2/12

Leu Asp Val

1

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 5

Pro His Ser Arg Asn

1

5

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 6

Arg Lys Lys

1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 7

Asp Gly Glu Ala

1

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Tyr Ile Gly Ser Arg

1

5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

3/12

<400> 9

Ile Lys Val Ala Val

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 10

Arg Phe Tyr Val Val Met Trp Lys

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 11

Ile Arg Val Val Met

1 5

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 12

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Gln Thr Glu Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 13

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Thr Asp Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

4/12

<213> Artificial Sequence

<400> 14

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Thr Ala Leu

1

5

10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 15

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Lys Gln Tyr

1

5

10

15

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 16

Asn Glu Ala Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Ala Tyr Gln Thr

1

5

10

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 17

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Asn Glu Ala

1

5

10

15

Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Ala Tyr Gln Thr

20

25

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 18

Asn Glu Ala Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Ala Tyr Gln Thr Thr Tyr

1

5

10

15

Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

5/12

20

25

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 19

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val
1 5 10 15
Gln Lys Val Ala
20

<210> 20

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 20

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val
1 5 10 15
Gln Lys Val Ala Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu
20 25 30
Ala Asp Leu
35

<210> 21

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 21

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Lys Lys Leu
1 5 10 15
Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val Gln
20 25 30
Lys Val Ala
35

<210> 22

<211> 28

<212> PRT

6/12

<213> Artificial Sequence

<400> 22

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Lys Lys Thr
1 5 10 15
Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
20 25

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 23

Asp Arg Glu
1

<210> 24

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 24

Asp Glu Asp
1

<210> 25

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 25

His Ala Val
1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 26

Arg Gly Asp Ser
1

7/12

<210> 27
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 27
Arg Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
1 5 10 15
Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
20 25 30

<210> 28
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 28
Arg Glu Asp Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
1 5 10 15
Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
20 25 30

<210> 29
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 29
Tyr Ile Gly Ser Arg Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala
1 5 10 15
Asp Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp
20 25 30
Leu

<210> 30
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 30
Asp Glu Asp Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
1 5 10 15
Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

8/12

20

25

30

<210> 31

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 31

His Ala Val Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

1

5

10

15

Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

20

25

30

<210> 32

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 32

Arg Gly Asp Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu

1

5

10

15

Asp Arg Val Gln Lys Val Ala Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys

20

25

30

Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

35

<210> 33

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 33

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val

1

5

10

15

Gln Lys Val Ala Arg Gly Asp Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys

20

25

30

Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

35

<210> 34

<211> 38

<212> PRT

9/12

<213> Artificial Sequence

<400> 34

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val
1 5 10 15
Gln Lys Val Ala Lys Lys Arg Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys
20 25 30
Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
35

<210> 35

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 35

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val
1 5 10 15
Gln Lys Val Ala Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu
20 25 30
Ala Asp Leu Arg Gly Asp
35

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 36

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Ala Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 37

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu
1 5 10

<210> 38

<211> 39

10/12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 38

Arg Gly Asp Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu
1 5 10 15
Asp Arg Val Gln Lys Val Ala Lys Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala
20 25 30
Ala His Ala Glu Ile Asn Glu
35

<210> 39

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 39

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Ala Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15
Arg Gly Asp Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala
20 25 30
Asp Leu

<210> 40

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 40

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val
1 5 10 15
Gln Lys Val Ala Lys Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala
20 25 30
Glu Ile Asn Glu
35

<210> 41

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 41

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Ala Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala

11/12

1	5	10	15											
Lys	Lys	Thr	Tyr	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ala	Asp	Leu
		20						25					30	

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 42

Lys	Arg	Trp	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Val	Arg	Met	Tyr
1				5					10					15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 43

Trp	Glu	Phe	Val	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Val	Lys	Leu	Trp	Tyr	Gln
1				5				10						15

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 44

Lys	Arg	Lys	Arg	Ile	His	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr	Lys
1				5				10						15	

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 45

Ser	Lys	Ala	Phe	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala
1				5				10						15	

Ser Leu

<210> 46

<211> 13

12/12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 46

Leu Val Glu Glu Thr Ser Phe Ile Asp Ala Gly Ala Pro

1

5

10

<210> 47

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 47

Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Lys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu

1

5

10

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004460

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C07K19/00, C07K5/068, C07K5/11, C07K7/06, C07K7/08, C07K14/315, A61K39/09, A61P31/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C07K19/00, C07K5/068, C07K5/11, C07K7/06, C07K7/08, C07K14/315, A61K39/09, A61P31/12 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Swissprot/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, REGISTRY/CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kelly C. et al., Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II., FEBS Lett. (1989), Vol.258, No.1, pages 127 to 132	1-11,15
A	Akira YANO, Toshiki NISHIZAKI et al., "Adjuvant o Hitsuyo to Shinai Peptide Kogen no Sekkei Hoho ni Kanshite", Japanese journal of bacteriology, 28 February, 2003 (28.02.03), Vol.58, No.1, page 264	1-11,15
A	Atsuko ONO, Toshiki NISHIZAWA et al, "Biku Men'ekiyo Peptide Adjuvant ni Kanshite", Japanese journal of bacteriology, 28 February, 2003 (28.02.03), Vol.58, No.1, page 263	1-11,15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 May, 2004 (12.05.04)		Date of mailing of the international search report 25 May, 2004 (25.05.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004460

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Toshiki NISHIZAWA, "Taka Peptide Vaccine no Kaihatsu Kenkyu", Kanmin Kyodo Project Kenkyu Hokoku Heisei 9 Nendo Daiichi Bun'ya Life Science no Kiso toshitenno Biotechnology no Oyo to Hyoka Gijutsu no Kaihatsu (1998), pages 41 to 47	1-11,15
A	Toshiki NISHIZAWA, "Ushoku Saikin Byogen Idenshi no Hatsugen Chosetsu Kiko Kaiseki Gijutsu no Kaihatsu", Kanmin Kyodo Project Kenkyu Hokoku Heisei 6 Nendo Daiichi Bun'ya Life Science no Kiso toshitenno Biotechnology no Oyo to Hyoka Gijutsu no Kaihatsu (1995), pages 84 to 92	1-11,15
A	Toshiki NISHIZAWA, "Taka Peptide Vaccine no Kaihatsu Kenkyu", Kanmin Kyodo Project Kenkyu Hokoku Heisei 8 Nendo Daiichi Bun'ya Life Science no Kiso toshitenno Biotechnology no Oyo to Hyoka Gijutsu no Kaihatsu (1997), pages 51 to 59	1-11,15
P,A	WO 03/039470 A2 (DUKE UNIVERSITY), 15 May, 2003 (15.05.03), & US 2003/0147888 A1 & US 2004/0001851 A1	1-11,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004460

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12 to 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 12 to 14 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C07K19/00, C07K5/068, C07K5/11, C07K7/06, C07K7/08, C07K14/315, A61K39/09, A61P31/12		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C07K19/00, C07K5/068, C07K5/11, C07K7/06, C07K7/08, C07K14/315, A61K39/09, A61P31/12		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Swissprot/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, REGISTRY/CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTplus (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Kelly C, et. al., Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II., FEBS Lett. (1989), Vol. 258, No. 1, p. 127-132	1-11, 15
A	矢野明, 西澤俊樹, 他, アジュバンドを必要としないペプチド抗原の設計方法に 関して, 日本細菌学雑誌 (2003. 02. 28), Vol. 58, No. 1, p. 264	1-11, 15
A	小野塚温子, 西澤俊樹, 他, 鼻腔免疫用ペプチドアジュバントに関して, 日本細菌学雑誌 (2003. 02. 28), Vol. 58, No. 1, p. 263	1-11, 15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 12. 05. 2004	国際調査報告の発送日 25. 5. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 美葉子	4 N 9839
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	西沢俊樹, 多価ペプチドワクチンの開発研究, 官民共同プロジェクト研究報告 平成9年度 第一分野 ライフサイエンス の基礎としてのバイオテクノロジーの応用と評価技術の開発(1998), p. 41-47	1-11, 15
A	西沢俊樹, う蝕細菌病原遺伝子の発現調節機構解析技術の開発, 官民共同プロジェクト研究報告 平成6年度 第一分野 ライフサイエンス の基礎としてのバイオテクノロジーの応用と評価技術の開発(1995), p. 84-92	1-11, 15
A	西沢俊樹, 多価ペプチドワクチンの開発研究, 官民共同プロジェクト研究報告 平成8年度 第一分野 ライフサイエンス の基礎としてのバイオテクノロジーの応用と評価技術の開発(1997), p. 51-59	1-11, 15
PA	WO 03/039470 A2 (DUKE UNIVERSITY) 2003.05.15 & US 2003/0147888 A1 & US 2004/0001851 A1	1-11, 15

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 12-14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 12-14に係る発明は、ヒトの身体の治療による処置方法に該当するものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。